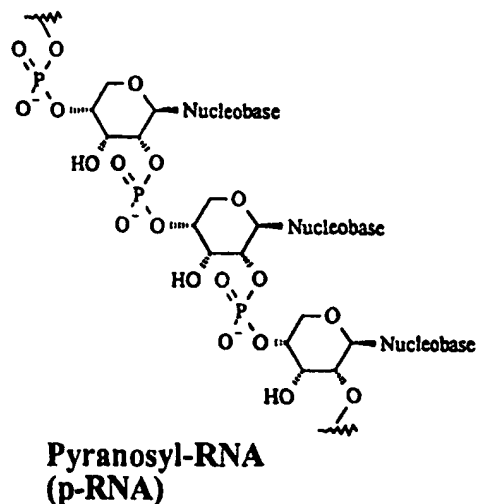
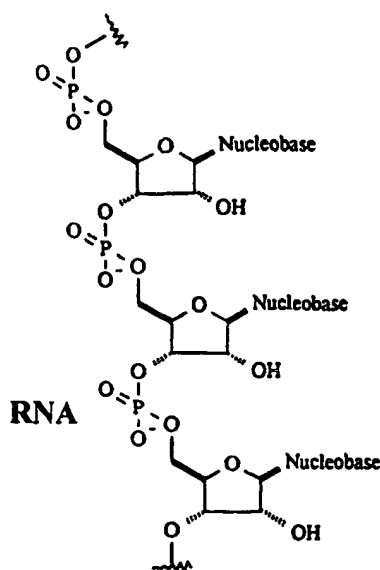




<p>(51) Internationale Patentklassifikation<sup>6</sup> : <b>C07H 21/00</b></p>	<p><b>A2</b></p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/52923</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 21. Oktober 1999 (21.10.99)</p>		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP99/02356</b></p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 7. April 1999 (07.04.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 15 901.3      8. April 1998 (08.04.98)      DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): <b>AVENTIS RESEARCH &amp; TECHNOLOGIES GMBH &amp; CO. KG</b> [DE/DE]; D-65926 Frankfurt am Main (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>ESCHENMOSER, Albert</b> [CH/CH]; Bergstrasse 9, CH-8700 Küsnacht (CH). <b>PITSCH, Stefan</b> [CH/CH]; Regensdorferstrasse 45, CH-8049 Zürich (CH). <b>WENDEBORN, Sebastian</b> [CH/CH]; Kapellenweg 11, CH-4102 Binningen (CH).</p> <p>(74) Anwalt: <b>BÖSL, Raphael</b>; Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck, Galileiplatz 1, D-81679 München (DE).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b>  <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP99/02356</b></p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 7. April 1999 (07.04.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 15 901.3      8. April 1998 (08.04.98)      DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): <b>AVENTIS RESEARCH &amp; TECHNOLOGIES GMBH &amp; CO. KG</b> [DE/DE]; D-65926 Frankfurt am Main (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>ESCHENMOSER, Albert</b> [CH/CH]; Bergstrasse 9, CH-8700 Küsnacht (CH). <b>PITSCH, Stefan</b> [CH/CH]; Regensdorferstrasse 45, CH-8049 Zürich (CH). <b>WENDEBORN, Sebastian</b> [CH/CH]; Kapellenweg 11, CH-4102 Binningen (CH).</p> <p>(74) Anwalt: <b>BÖSL, Raphael</b>; Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck, Galileiplatz 1, D-81679 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b>  <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP99/02356</b></p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 7. April 1999 (07.04.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 15 901.3      8. April 1998 (08.04.98)      DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): <b>AVENTIS RESEARCH &amp; TECHNOLOGIES GMBH &amp; CO. KG</b> [DE/DE]; D-65926 Frankfurt am Main (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>ESCHENMOSER, Albert</b> [CH/CH]; Bergstrasse 9, CH-8700 Küsnacht (CH). <b>PITSCH, Stefan</b> [CH/CH]; Regensdorferstrasse 45, CH-8049 Zürich (CH). <b>WENDEBORN, Sebastian</b> [CH/CH]; Kapellenweg 11, CH-4102 Binningen (CH).</p> <p>(74) Anwalt: <b>BÖSL, Raphael</b>; Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck, Galileiplatz 1, D-81679 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b>  <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>			

(54) Title: METHOD FOR THE PRODUCTION OF PENTOPYRANOSYL NUCLEOSIDES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON PENTOPYRANOSYL-NUCLEOSIDEN



(57) Abstract

The invention relates to a method for the production of a pentopyranosyl nucleoside 3', 4'-cyclic acetal, whereby a pentopyranosyl nucleoside is made to react with an aldehyde, ketone, acetal or ketal under a vacuum.

**BEST AVAILABLE COPY**

**(57) Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines 3', 4'-cyclischen Acetals eines Pentopyranosyl-Nucleosids, bei dem ein Pentopyranosyl-Nucleosid mit einem Aldehyd, Keton, Acetal oder Ketal unter Unterdruck umgesetzt wird.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

## 5                    **Verfahren zur Herstellung von Pentopyranosyl-Nucleosiden**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines 3', 4'-  
cyclischen Acetals eines Pentopyranosyl-Nucleosids, bei dem ein Pentopyranosyl-  
Nucleosid mit einem Aldehyd, Keton, Acetal oder Ketal unter Unterdruck umge-  
10        setzt wird.

Pyranosyl-Nucleinsäuren (p-NA's) sind im allgemeinen zur natürlichen RNA iso-  
mere Strukturtypen, bei denen die Pentose-Einheiten in der Pyranoseform vorlie-  
gen und durch Phosphodiestergruppen zwischen den Positionen C-2' und C-4'  
15        repetitiv verknüpft sind (Fig. 1). Unter "Nucleobase" werden dabei die kanoni-  
schen Nucleobasen A, T, U, C, G, aber auch die Paare Isoguanin/Isocytosin und  
2,6-Diaminopurin/Xanthin und im Sinne der vorliegenden Erfindung auch andere  
Purine und Pyrimidine verstanden. p-NA's, und zwar die von der Ribose abgelei-  
tete p-RNA's, wurden zum erstenmal von Eschenmoser et al. beschrieben (s. S.  
20        Pitsch et al., *Helv. Chim. Acta* 76, 2161 (1993); S. Pitsch et al., *Helv. Chim. Acta*  
78, 1621 (1995); ???, *Angew. Chem.* 108, 1619-1623 (1996)). Sie bilden aus-  
schließlich sogenannte Watson-Crick-gepaarte, d.h. Purin-Pyrimidin- und Purin-  
Purin-gepaarte, antiparallele, reversibel „schmelzende“, quasi-lineare und stabile  
Duplices. Homochirale p-RNA-Stränge entgegengesetzten Chiralitätssinns paaren  
25        ebenfalls kontrollierbar und sind in der gebildeten Duplex streng nicht-helical.  
Diese für den Aufbau supramolekularer Einheiten wertvolle Spezifität hängt mit  
der relativ geringen Flexibilität des Ribopyranosephosphat-Rückgrats sowie mit  
der starken Neigung der Basenebene zur Strangachse und der hieraus folgenden  
Tendenz zu intercatenarer Basenstapelung im resultierenden Duplex zusammen  
30        und läßt sich letztlich auf die Teilnahme eines 2',4'-cis-disubstituierten Ribopyra-  
noserings am Aufbau des Rückgrates zurückführen. Diese wesentlich besseren  
Paarungseigenschaften machen p-NA's gegenüber DNA und RNA für die An-

wendung des Aufbaus supramolekularer Einheiten zu bevorzugten Paarungssystemen. Sie bilden ein zu natürlichen Nucleinsäuren orthogonales Paarungssystem, d. h. sie paaren nicht mit in der natürlich Form vorkommenden DNA's und RNA's, was im besonderen im diagnostischen Bereich von Bedeutung ist.

5

Eschenmoser et al. hat zum ersten Mal eine p-RNA, wie in Fig. 2 dargestellt und nachstehend erläutert, hergestellt (s. auch S. Pitsch et al. (1993), supra)

Hierbei wurde eine geeignete geschützte Nucleobase mit dem Anomerengemisch der Tetrabenzoyl-Ribopyranose durch Einwirken von Bis(trimethylsilyl)acetamid und einer Lewis-Säure wie z. B. Trimethylsilyl-trifluormethansulfonat zur Reaktion gebracht (analog Vorbrüggen, H. et al., *Chem. Ber.* 114, 1234 (1981)). Unter Baseneinwirkung (NaOH in THF/Methanol/Wasser im Falle der Purine; gesättigter Ammoniak in MeOH im Falle der Pyrimidine) wurden die Acylschutzgruppen vom Zucker abgespalten, und das Produkt unter saurer Katalyse mit p-Anisaldehyddimethylacetal in 3',4'-Position geschützt. Das Diastereomeregemisch wurde in 2'-Stellung acyliert, das 3',4'-methoxybenzylidengeschützte 2'-Benzoat durch saure Behandlung, z.B. mit Trifluoressigsäure in Methanol deacetalisiert, und mit Dimethoxytritylchlorid umgesetzt. Die 2'--3'-Wanderung des Benzoats wurde durch Behandlung mit p-Nitrophenol/4-(Dimethylamino)pyridin/Triethylamin/Pyridin/n-Propanol eingeleitet. Fast alle Reaktionen wurden durch Säulenchromatographie aufgearbeitet. Der so synthetisierte Schlüsselbaustein, das 4'-DMT-3'-benzoyl-1'-Nucleobasen-Derivat der Ribopyranose, wurde dann zum Teil phosphityliert bzw. über einen Linker an eine feste Phase gebunden.

Bei der anschließenden automatisierten Oligonucleotidsynthese wurde die trägergebundene Komponente in 4'-Position wiederholt sauer entschützt, ein Phosphoramidit unter Einwirkung eines Kupplungsreagenz, z. B. ein Tetrazolderivat, angekuppelt, noch freie 4'-Sauerstoffatome acetyliert und das Phosphoratom oxi-

30

diert, um so das oligomere Produkt zu erhalten. Anschließend wurden die restlichen Schutzgruppen abgespalten, das Produkt über HPLC gereinigt und entsalzt.

Das von Eschenmoser et al. beschriebene Verfahren kann jedoch nicht mit den  
5 angegebenen Ausbeuten reproduziert werden und ist somit für eine Anwendung im industriellen Maßstab kaum geeignet.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher, ein Verfahren bereitzustellen, das eine Herstellung von Pentopyranosyl-Nucleosiden im industriellen Maßstab er-  
10 möglicht.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß die Herstellung des 3', 4'-cyclischen Acetals eines Pentopyranosyl-Nucleosids, das ein Zwischenprodukt bei der Eschenmoser-Synthese ist, erst dann in nennenswerten Ausbeuten gelingt,  
15 wenn das Pentopyranosyl-Nucleosid unter Unterdruck mit einem Aldehyd oder Keton bzw. mit einem Acetal oder Ketal umgesetzt wird.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung eines 3', 4'-cyclischen Acetals eines Pentopyranosyl-Nucleosids, bei dem ein  
20 Pentopyranosyl-Nucleosid mit einem Aldehyd, Keton, Acetal oder Ketal unter Unterdruck umgesetzt wird.

Unter dem Begriff Unterdruck versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung insbesondere ein Druck von weniger als ca. 500 mbar, vorzugsweise von weniger  
25 als ca. 100 mbar, insbesondere von weniger als ca. 50 mbar, vor allem von ca. 30 mbar.

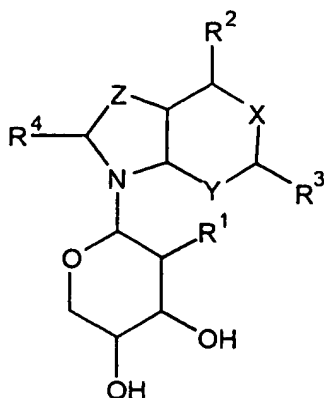
Der Aldehyd ist beispielsweise Formaldehyd, Acetaldehyd, Benzaldehyd oder 4-Methoxybenzaldehyd, das Acetal Formaldehyd-dimethylacetal, Acetaldehyd-dimethylacetal,  
30 Benzaldehyd-dimethylacetal oder 4-Methoxybenzaldehyd-dimethylacetal, das Keton Aceton, Cyclopentanon oder Cyclohexanon und das

Ketal Acetondimethylketal, Cyclopentanon-dimethylketal, Cyclohexanon-dimethylketal oder in Form von 2-Methoxypropen.

In einer besonderen Ausführungsform wird das Pentopyranosyl-Nucleosid vor der  
5 Umsetzung beispielsweise über  $\text{SiO}_2$ , vorzugsweise über  $\text{SiO}_2$  in Form von Kieselgel, gereinigt. Hierzu eignet sich beispielsweise eine Reinigung über eine Kieselgel-Chromatographiesäule. Für die Elutions des Pentopyranosyl-Nucleosids eignet sich z. B. ein Gradient von ca. 1-20% oder ca. 5-15% Methanol in Dichlormethan. Besonders vorteilhaft ist es, wenn das Pentopyranosyl-Nucleosid  
10 vor der Reinigung beispielsweise mit einer 1%igen Salzsäurelösung oder mit festem Ammoniumchlorid neutralisiert wird und gegebenenfalls die Lösemittel abgezogen werden..

Als Pentopyranosyl-Nucleosid eignet sich im allgemeinen ein Ribo-, Arabino-,  
15 Lyxo- oder Xylo-pyranosyl-Nucleosid. Beispiele von geeigneten Pentopyranosyl-Nucleosiden sind ein Pentopyranosyl-purin, -2,6-diaminopurin, -6-purinthiol, -pyridin, -pyrimidin, -adenosin, -guanosin, -isoguanosin, -6-thioguanosin, -xanthin, -hypoxanthin, -thymidin, -cytosin, -isocytosin, -indol, -tryptamin, -N-phthaloyl-tryptamin, -uracil, -coffein, -theobromin, -theophyllin, -benzotriazol oder -  
20 acridin.

Formelmäßig können die Pentopyranosyl-Nucleoside durch die Formel (I)

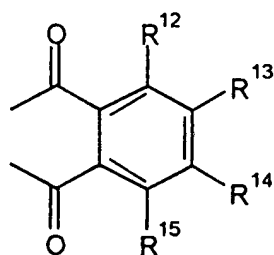


(I),

worin

$R^1$  gleich H, OH oder Hal mit Hal gleich Br oder Cl,

- 5  $R^2$ ,  $R^3$  und  $R^4$  unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils H, Hal mit Hal gleich Br oder Cl,  $NR^5R^6$ ,  $OR^7$ ,  $SR^8$ ,  $=O$ ,  $C_nH_{2n+1}$  mit n eine ganze Zahl von 1-12, vorzugsweise 1-8, insbesondere 1-4, oder  $(C_nH_{2n})NR^{10}R^{11}$  mit  $R^{10}R^{11}$  gleich H,  $C_nH_{2n+1}$  oder  $R^{10}R^{11}$  verbunden über einen Rest der Formel



(III),

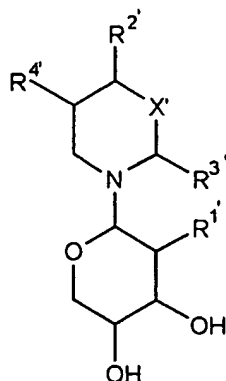
worin  $R^{12}$ ,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$  und  $R^{15}$  unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils H,  $OR^7$ , wobei  $R^7$  die genannte Bedeutung hat, oder  $C_nH_{2n+1}$ , oder  $C_nH_{2n-1}$ , wobei n die oben genannte Bedeutung hat, bedeuten und

- 15  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$  und  $R^8$  unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils H,  $C_nH_{2n+1}$ , oder  $C_nH_{2n-1}$ , wobei n die oben genannte Bedeutung hat,  $-C(O)R^9$  mit  $R^9$

gleich ein linearer oder verzweigter, gegebenenfalls substituierter Alkyl-, Aryl-, vorzugsweise Phenyl-Rest,

X, Y und Z unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils =N-, =C(R<sup>16</sup>)- oder -N(R<sup>17</sup>)- mit R<sup>16</sup> und R<sup>17</sup> unabhängig voneinander, gleich oder  
 5 verschieden, jeweils H oder C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub> oder (C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>)NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup> mit den oben genannten Bedeutungen, bedeutet,

oder durch die Formel (II)



(II),

10

worin R<sup>1'</sup> gleich H, OH oder Hal mit Hal gleich Br oder Cl,

R<sup>2'</sup>, R<sup>3'</sup> und R<sup>4'</sup> unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils H, Hal mit Hal gleich Br oder Cl, =O, C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub> oder OC<sub>n</sub>H<sub>2n-1</sub>, oder (C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>)NR<sup>10'</sup>R<sup>11'</sup>,  
 15 wobei R<sup>10'</sup>, R<sup>11'</sup>, unabhängig voneinander die oben genannte Bedeutung von R<sup>10</sup> bzw. R<sup>11</sup> hat, und

X' jeweils =N-, =C(R<sup>16'</sup>)- oder -N(R<sup>17'</sup>)- bedeutet, wobei R<sup>16'</sup> und R<sup>17'</sup> unabhängig voneinander die oben genannte Bedeutung von R<sup>16</sup> bzw. R<sup>17</sup> haben, dargestellt werden.

20

Das erfindungsgemäße Verfahren erfolgt im allgemeinen bei einer Temperatur von ca. 40-70 °C, vorzugsweise von ca. 50-60 °C, insbesondere von ca. 50-55 °C. Ferner wird die Umsetzung im allgemeinen unter saurer Katalyse beispielsweise



in Gegenwart von p-Toluolsulfonsäure, Methansulfonsäure, Tetrafluoroborsäure, Schwefelsäure, sauren Ionenaustauscher, wie z. B. saure Amberlite® (Rohm & Haas) und/oder Lewissäuren, wie z. B. Zinkchlorid, Trimethylsilyltriflat oder Pyridiniumparatoluolsulfonat, durchgeführt. Die Reaktionszeiten betragen üblicherweise ca. 1-1,5 Stunden, vorzugsweise ca. 1,5 Stunden.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann in einem weiteren Schritt das gemäß dem obigen Verfahren erhaltene 3', 4'-cyclische Acetal eines Pentopyranosyl-Nucleosids an der 2'-Position geschützt werden. Vorzugsweise wird die 2'-Position durch eine basenlabile oder metallkatalysiert abspaltbare Schutzgruppe, insbesondere durch eine Acylgruppe, vor allem durch eine Acetyl-, Benzoyl-, Nitrobenzoyl- und/oder Methoxybenzoylgruppe, nach dem Fachmann bekannten Verfahren beispielsweise mit Benzoylchlorid in einer Dimethylaminopyridin/Pyridin-Lösung bei Raumtemperatur geschützt.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann das an der 2'-Position geschützte 3', 4'-cyclische Acetal eines Pentopyranosyl-Nucleosids deketalisiert werden. Im allgemeinen erfolgt die Deketalisierung in Gegenwart einer Säure, vorzugsweise in Gegenwart einer starken Säure, wie z. B. Trifluoressigsäure. Die Aufarbeitung des erhaltenen Reaktionsproduktes erfolgt vorzugsweise trocken-basisch, beispielsweise in Anwesenheit von festem Hydrogencarbonat, Carbonat und/oder basischem Ionenaustauscher, wie z. B. basische Amberlite® (Rohm & Haas). Anschließend kann das aufgearbeitete Reaktionsprodukt beispielsweise über SiO<sub>2</sub>, insbesondere über SiO<sub>2</sub> in Form von Kieselgel, gereinigt werden.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann in einem weiteren Schritt auch die 4'-Position geschützt werden. Als Schutzgruppe eignet sich im allgemeinen eine säure- oder basenlabile Schutzgruppe, vorzugsweise eine Trityl-Gruppe, insbesondere eine DMT-Gruppe, und/oder eine β-

eliminierbare Gruppe, insbesondere eine Fmoc-Gruppe. Die Einführung einer Schutzgruppe erfolgt nach allgemein bekannten Verfahren beispielsweise durch Dimethoxytritylchlorid in Gegenwart von z. B. N-Ethyldiisopropylamin (Hünig-Base).

5

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann in einem weiteren Schritt eine Umlagerung der Schutzgruppe von der 2'-Position zur 3'-Position erfolgen. Im allgemeinen wird die Umlagerung in Gegenwart einer Base, insbesondere in Gegenwart von N-Ethyldiisopropylamin und/oder Triethylamin nach allgemein bekannten Verfahren, z. B. in Gegenwart einer Mischung  
10 aus N-Ethyldiisopropylamin, Isopropanol, p-Nitrophenol und Dimethylaminopyridin in Pyridin, bei erhöhter Temperatur, z. B. ca. 60 °C, durchgeführt. Die erhaltenen Produkte können anschließend mittels Chromatographie über SiO<sub>2</sub>, insbesondere über SiO<sub>2</sub> in Form von Kieselgel, und/oder Kristallisation gereinigt  
15 werden.

Die Ausgangsverbindung für das beschriebene erfindungsgemäße Verfahren, das Pentopyranosyl-Nucleosid, läßt sich beispielsweise dadurch herstellen, daß zuerst eine geschützte Nucleobase mit einer geschützten Ribopyranose umgesetzt wird  
20 und anschließend die Schutzgruppen von dem Ribopyranosyl-Teil abgespalten werden. Das Verfahren kann beispielsweise wie bei Pitsch et al. (1993), supra, oder Pitsch et al. (1995), supra, beschrieben durchgeführt werden. Hierbei ist es zur Vermeidung weiterer zeit- und materialaufwendiger Chromatographien vorteilhaft, nur anomenreine geschützte Pentopyranosen, wie z. B. Tetrabenzoyl-  
25 pentopyranosen, vorzugsweise β-Tetrabenzoyl-ribopyranosen (R. Jeanloz, J. Am. Chem. Soc. 1948, 70, 4052), einzusetzen.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein Verfahren zur Herstellung eines Ribopyranosyl-nucleosids, bei dem  
30 (a) eine geschützte Nucleobase mit einer geschützten Ribopyranose umgesetzt wird,

- (b) die Schutzgruppen von dem Ribopyranosyl-Teil des Produktes aus Schritt (a) abgespalten werden, und
- (c) das Produkt aus Schritt (b) gemäß dem oben näher beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren umgesetzt wird.

5

Zur Herstellung einer Pentopyranosyl-Nucleinsäure wird das erhaltene Pentopyranosyl-nucleosid in einem weiteren Schritt entweder für die Oligomerisierung phosphityliert oder für die Festphasensynthese an eine feste Phase gebunden. Die Phosphitylierung erfolgt beispielsweise durch Phosphorigsäuremonoallylester-diisopropyl-amidchlorid in Anwesenheit einer Base, z. B. N-Ethyl-diisopropylamin. Die Bindung eines geschützten erfindungsgemäßen Pentopyranosyl-Nucleosids an eine feste Phase, z. B. „long-chain-alkylamino-controlled pore glass“ (CPG, Sigma Chemie, München) kann beispielsweise wie bei Pitsch et al. (1993), supra, beschrieben erfolgen.

15

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich daher auf ein Verfahren zur Herstellung einer Pentopyranosyl-Nucleinsäure, bei dem

- (a) in einem ersten Schritt ein Pentopyranosyl-Nucleosid nach dem oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wird,
- 20 (b) in einem zweiten Schritt das gemäß Schritt (a) hergestellte Pentopyranosyl-Nucleosid an eine feste Phase gebunden wird, und
- (c) in einem weiteren Schritt das gemäß Schritt (b) an eine feste Phase gebundene Pentopyranosyl-nucleosid um ein phosphityliertes 3', 4'-geschütztes Pentopyranosyl-Nucleosid verlängert wird, und
- 25 (d) Schritt (c) solange mit gleichen oder verschiedenen phosphitylierten 3', 4'-geschützten Pentopyranosyl-Nucleosiden wiederholt wird, bis die gewünschte Pentopyranosyl-Nucleinsäure erhalten wird.

In einer besonderen Ausführungsform können in Schritt (b) und/oder Schritt (c) auch die bei der allgemein bekannten Nucleinsäuresynthese üblichen Pentofuranosyl-nucleoside, wie beispielsweise das in ihrer natürlichen Form vorkommende Adenosin, Guanosin, Cytidin, Thymidin und/oder Uracil (siehe z. B. Uhlmann, E. & Peyman, A. (1990). Chemical Reviews, 90, 543-584 No. 4) eingebaut werden, wodurch eine gemischte Nucleinsäure aus Pentopyranosyl-Nucleosiden und Pentofuranosyl-nucleosiden mit neuen Eigenschaften entsteht.

Als Kupplungsreagenz für die Verlängerung gemäß Schritt (c) werden im allgemeinen saure Aktivatoren, vorzugsweise 5-(4-Nitrophenyl)-1H-tetrazol, insbesondere Benzimidazoliumtriflat eingesetzt, da bei Benzimidazoliumtriflat im Gegensatz zu 5-(4-Nitrophenyl)-1H-tetrazol als Kupplungsreagenz keine Verstopfung der Kupplungsreagenz-Leitungen und eine Verunreinigung des Produktes erfolgt.

Weiterhin ist es vorteilhaft durch Zusatz von einem Salz, wie Natriumchlorid, zur schutzgruppenabspaltenden Hydrazinolyse die Nucleobasen, insbesondere Pyrimidinbasen, vor allem Uracil und Thymin, vor einer Ringöffnung zu schützen, die das Oligonukleotid zerstören würde. Allyloxygruppen können vorzugsweise durch Palladium [Pd(0)]-Komplexe z. B. vor der Hydrazinolyse abgespalten werden.

20

Die Abspaltung der gebildeten Nucleinsäure von der festen Phase erfolgt im allgemeinen ebenso durch Hydrazinolyse.

In einer weiteren erfindungsgemäßen Ausführungsform werden daher in einem weiteren Schritt (e) die Schutzgruppen und die gebildete Pentopyranosyl-Nucleinsäure von der festen Phase abgespalten.

Im allgemeinen werden die erfindungsgemäß hergestellten Pentopyranosyl-Nucleinsäuren chromatographisch beispielsweise über alkylsilyliertes Kieselgel, vorzugsweise über RP-C<sub>18</sub>-Kieselgel, gereinigt.

30

Eine beispielhafte Übersicht über das erfindungsgemäße Verfahren einschließlich weiterer Ausführungsformen liefert Fig. 3.

Die erfindungsgemäß hergestellten Pentopyranosyl-Nucleinsäuren eignen sich  
5 beispielsweise zur Herstellung von Paarungssystemen oder Konjugaten.

Paarungssysteme sind supramolekulare Systeme nicht kovalenter Wechselwirkung, die sich durch Selektivität, Stabilität und Reversibilität auszeichnen, und deren Eigenschaften bevorzugt thermodynamisch, d. h. durch Temperatur, pH-  
10 Wert und Konzentration beeinflusst werden. Solche Paarungssysteme können z. B. aufgrund ihrer selektiven Eigenschaften auch als „molekularer Klebstoff“ für die Zusammenführung von unterschiedlichen Metallclustern zu Cluster-Verbänden mit potentiell neuen Eigenschaften verwendet werden [siehe z. B. R. L. Letsinger, et al., Nature 1996, 382, 607-9; P. G. Schultz et al., Nature 1996, 382, 609-11].  
15 Folglich eignen sich die p-NA's auch für die Anwendung im Bereich der Nanotechnologie, beispielsweise zur Herstellung neuer Materialien, Diagnostika und Therapeutika sowie mikroelektronischer, photonischer bzw. optoelektronischer Bauteile und für das kontrollierte Zusammenführen molekularer Species zu supramolekularen Einheiten, wie z. B. für den (kombinatorischen) Aufbau von  
20 Protein assemblies [siehe z. B. A. Lombardi, J. W. Bryson, W. F. DeGrado, Biomoleküls (Pept. Sci.) 1997, 40, 495-504], da p-NA's Paarungssysteme bilden, die stark und thermodynamisch kontrollierbar sind. Eine weitere Anwendung ergibt sich daher gerade im diagnostischen und drug discovery-Bereich durch die Möglichkeit, funktionelle, bevorzugt biologische Einheiten wie Proteine oder  
25 DNA/RNA-Abschnitte, mit einem p-NA-Code zu versehen, der nicht mit den natürlichen Nucleinsäuren interferiert (siehe z. B. WO93/20242).

Des weiteren kann ein Biomolekül, z. B. DNA oder RNA, zum nicht-kovalenten Verbinden (Linken) mit einem anderen Biomolekül, z. B. DNA oder RNA, verwendet werden, wenn beide Biomoleküle Abschnitte enthalten, die aufgrund  
30 komplementärer Sequenzen von Nucleobasen durch Ausbildung von Wasserstoff-

brücken aneinander binden können. Derartige Biomoleküle finden z. B. in analytischen Systemen zur Signalamplifizierung Verwendung, wo ein in seiner Sequenz zu analysierendes DNA-Molekül über einen solchen nicht-kovalenten DNA-Linker zum einen an einen festen Träger immobilisiert, und zum anderen an ein  
5 signalverstärkendes branchedDNA-Molekül (bDNA) gebunden werden soll (siehe Fig. 3; S. Urdea, Bio/Technol. 1994, 12, 926 oder US-Patent Nr. 5,624,802). Ein wesentlicher Nachteil der zuletzt beschriebenen Systeme ist, daß sie den Verfahren zur Nucleinsäure-Diagnostik durch Polymerase-Chain-Reaction (PCR) (K. Mullis, Methods Enzymol. 1987, 155, 335) hinsichtlich der Empfindlichkeit bis  
10 jetzt unterlegen sind. Das ist u. a. darauf zurückzuführen, daß die nicht-kovalente Bindung vom festen Träger an das zu analysierende DNA-Molekül ebenso wie die nicht-kovalente Bindung des zu analysierenden DNA-Moleküls nicht immer spezifisch erfolgt, wodurch es zu einer Vermischung der Funktionen „Sequenzerkennung“ und „nicht-kovalente Bindung“ kommt. Die Verwendung von p-NA's als  
15 orthogonales Paarungssystem, welches nicht in das DNA- bzw. RNA-Paarungsgeschehen eingreift, löst dieses Problem auf vorteilhafte Weise, wodurch die Empfindlichkeit der beschriebenen analytischen Verfahren deutlich erhöht werden kann.

20 Konjugate sind im Sinne der vorliegenden Erfindung kovalent gebundene Hybride aus p-NA's und anderen Biomolekülen, vorzugsweise ein Peptid, Protein oder eine Nucleinsäure, beispielsweise ein Antikörper oder ein funktioneller Teil davon oder eine in ihrer natürlichen Form vorkommende DNA und/oder RNA. Funktionelle Teile von Antikörper sind beispielsweise Fv-Fragmente (Skerra & Plückthun  
25 (1988) Science 240, 1038), einzelkettige Fv-Fragmente (scFv; Bird et al. (1988), Science 242, 423; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5879) oder Fab-Fragmente (Better et al. (1988) Science 240, 1041). Bevorzugt sind im allgemeinen p-RNA/DNA- bzw p-RNA/RNA-Konjugate.

30 Konjugate werden dann vorzugsweise verwendet, wenn die Funktionen „Sequenzerkennung“ und „nicht-kovalente Bindung“ in einem Molekül realisiert werden

müssen, da die Konjugate zwei zueinander orthogonale Paarungssysteme enthalten.

Unter dem Begriff Konjugat im Sinne der vorliegenden Erfindung sind auch sogenannte Arrays zu verstehen. Arrays sind Anordnungen von immobilisierten Erkennungsspecies, die speziell in der Analytik und Diagnostik eine wichtige Rolle bei der simultanen Bestimmung von Analyten spielen. Beispiele sind Peptide-Arrays (Fodor et al., Nature 1993, 364, 555) und Nucleinsäure-Arrays (Southern et al. Genomics 1992, 13, 1008; Heller, US-Patent Nr. 5,632,957). Eine höhere Flexibilität dieser Arrays kann dadurch erreicht werden, daß die Erkennungsspecies an codierende Oligonucleotide gebunden werden und die zugehörigen, komplementären Stränge an bestimmte Positionen auf einem festen Träger. Durch Aufbringen der codierten Erkennungsspecies auf den „anti-codierten“ festen Träger und Einstellung von Hybridisierungsbedingungen werden die Erkennungsspecies an den gewünschten Positionen nicht-kovalent gebunden. Dadurch können verschiedene Typen von Erkennungsspecies, wie z. B. DNA-Abschnitte, Antikörper, nur durch Anwendung von Hybridisierungsbedingungen gleichzeitig auf einem festen Träger angeordnet werden. Voraussetzung hierzu sind aber äußerst starke, selektive - um die codierenden Abschnitte möglichst kurz zu halten - und mit natürlicher Nucleinsäure nicht interferierender Codons und Anticodons notwendig. p-NA's, vorzugsweise p-RNA's eignen sich hierzu in besonders vorteilhafter Weise.

Für die Herstellung von Konjugaten sind sowohl sequentielle als auch konvergente Verfahren geeignet, wobei sich konvergente Verfahren aufgrund ihrer Flexibilität als besonders bevorzugt erweisen.

In einem sequentiellen Verfahren wird z. B. nach erfolgter automatisierter Synthese eines p-RNA-Oligomeren direkt am gleichen Synthesizer - nach Umstellung der Reagenzien und des Kupplungsprotokolls - z. B. ein DNA-Oligonukleotid

weilersynthetisiert. Dieser Vorgang läßt sich auch in umgekehrter Reihenfolge durchführen.

In einem konvergenten Verfahren werden z. B. p-RNA-Oligomere mit Aminoter-  
 5 minalen-Linkern und z. B. DNA-Oligomere mit z. B. Thiol-Linkern in getrennten  
 Vorgängen synthetisiert. Anschließend erfolgt vorzugsweise eine Jodacetylierung  
 des p-RNA-Oligomeren und die Kupplung der beiden Einheiten nach literaturbe-  
 kannten Protokollen (T. Zhu et al., Bioconjug. Chem. 1994, 5, 312).

10 Besonders bevorzugte aminoterminaler Linker sind Allyloxy-Linker der Formel  
 (IV)



15 worin  $S_{c1}$  und  $S_{c4}$  unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils eine  
 Schutzgruppe insbesondere ausgewählt aus Fmoc und/oder DMT,  
 $S_{c2}$  und  $S_{c3}$  unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils eine Ally-  
 loxy- und/oder Diisopropylamino-Gruppe und n eine ganze Zahl von 1-12, vor-  
 zugsweise 1-8, insbesondere 1-4 bedeuten. Ein besonders bevorzugter Allyloxy-  
 20 Linker ist 2-(S)-N-Fmoc-O<sup>1</sup>-DMT-O<sup>2</sup>-allyloxydiisopropylaminophosphinyl-6-  
 amino-1,2-hexandiol.

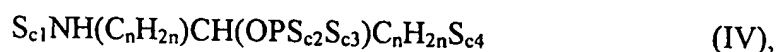
2-(S)-N-Fmoc-O<sup>1</sup>-DMT-O<sup>2</sup>-allyloxydiisopropylaminophosphinyl-6-amino-1,2-  
 hexandiol läßt sich beispielsweise aus 6-Amino-2(S)-hydroxyhexansäure herstel-  
 25 len. 6-Amino-2(S)-hydroxyhexansäure kann nach literaturbekannter Weise durch  
 Diazotierung und anschließender Hydrolyse aus L-Lysin hergestellt werden (K.-I.  
 Aketa, *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 621 (1976)). Dieses wird anschließend mit  
 FmocCl zum 2-(S)-N-Fmoc-6-amino-1,2-hexandiol umgesetzt, welches gemäß  
 WO 89/02439 zum 2-(S)-N-Fmoc-O<sup>1</sup>-DMT-6-amino-1,2-hexandiol DM-trityliert  
 30 werden kann. Dieses wird beispielsweise in Anwesenheit von Ethyldiisopropyla-



min und Chlor-N,N-diisopropylaminoallyloxyphosphin zum 2-(S)-N-Fmoc-O<sup>1</sup>-DMT-O<sup>2</sup>-allyloxydiisopropylaminophosphinyl-6-amino-1,2-hexandiol umgesetzt.

Ausgehend von z. B. Lysin können somit in wenigen Reaktionsschritten amino-  
 5 terminale Linker aufgebaut werden, die sowohl eine aktivierbare Phosphorverbin-  
 dung als auch eine säurelabile Schutzgruppe, wie DMT, tragen und daher leicht in  
 der automatisierbaren Oligonucleotidsynthese verwendet werden können (siehe z.  
 B. P. S. Nelson et al., *Nucleic Acid Res.* 17, 7179 (1989); L. J. Arnold et al., WO  
 89/02439). Ein Lysin-basierender Linker, bei dem anstelle der sonst üblichen Cy-  
 10 anoethyl-Gruppe am Phosphoratom eine Allyloxy-Gruppe eingebracht ist, kann in  
 vorteilhafter Weise in der Noyori-Oligonucleotid-Methode eingesetzt werden (R.  
 Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* 112, 1691-6 (1990)).

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur  
 15 Herstellung von Pentopyranosyl-Nucleinsäuren wird daher in einem weiteren  
 Schritt ein Allyloxy-Linker der Formel (III)



20 worin S<sub>c1</sub> und S<sub>c4</sub> unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils eine  
 Schutzgruppe insbesondere ausgewählt aus Fmoc und/oder DMT,  
 S<sub>c2</sub> und S<sub>c3</sub> unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils eine Ally-  
 loxy- und/oder Diisopropylamino-Gruppe und n eine ganze Zahl von 1-12, vor-  
 zugsweise 1-8, insbesondere 1-4 bedeuten, eingebaut.

25

Daneben weisen Indolderivate als Linker (s. z.B. Formel (I) in Verbindung mit  
 Formel (III)) den Vorzug der Fluoreszenzfähigkeit auf und sind daher für Nano-  
 technologie-Anwendungen, bei denen es ggf. um den Nachweis kleinster Sub-  
 stanzmengen geht, besonders bevorzugt. Beispielsweise eignen sich Indol-1-  
 30 riboside, wie bei N. N. Suvorov et al., *Biol. Aktivn. Soedin.*, Akad. Nauk SSSR, 60

(1965) und Tetrahedron 23, 4653 (1967) bereits beschrieben. 3-substituierte Derivate werden im allgemeinen über die Bildung eines Amins der ungeschützten Zuckerkomponente und einem Indolin, welches dann durch Oxidation in das Indol-1-ribosid übergeführt wird, hergestellt. Beschrieben wurden z. B. Indol-1-glucoside und -1-arabinside (Y. V. Dobrynin et al., *Khim.-Farm. Zh.* 12, 33 (1978)), deren 3-substituierte Derivate im allgemeinen über Vielsmeier-Reaktion hergestellt werden können.

Für die Herstellung Indol-basierender Linker geht man beispielsweise von Phthalsäureanhydrid und Tryptamin aus, welche zum N-Phthaloyltryptamin umgesetzt werden (Kuehne et al., *J. Org. Chem.* 43, 13, 2733-2735 (1987)). Dieses wird z. B. mit Boran-THF zum Indolin reduziert (analog A. Giannis et al., *Angew. Chem.* 101, 220 (1989)). Anschließend kann das 3-substituierte Indolin zuerst mit Ribose zum Nucleosidtriol und dann mit Essigsäureanhydrid zum Triacetat umgesetzt werden. Anschließend oxidiert man beispielsweise mit 2,3-Dichlor-5,6-dicyanoparachinon, spaltet die Acetate mit z. B. Natriummethylat, benzyliert selektiv in 2'-Position, DM-trityliert selektiv in 4'-Position, und führt die Wanderungsreaktion zum 3'-Benzoat durch. Die Bildung des Phosphoramidits erfolgt nach bekannten Verfahren. Dieser läßt sich ohne Änderung der Syntheseprotokolle für die automatisierte Oligonucleotidsynthese einsetzen.

Weitere für das erfindungsgemäße Verfahren geeignete Linker (s. z.B. Formel (II) in Verbindung mit Formel (III)) sind Uracil-basierende Linker, bei denen die 5'-Position des Uracils modifiziert wurde. Ein geeignetes Beispiel ist N-Phthaloylaminoethyluracil, das aus Hydroxyethyluracil gewonnen werden kann.

Die Herstellung von Hydroxyethyluracil gelingt im großen Maßstab nach bekannter Methode (J.D. Fissekis, A. Myles, G.B. Brown, *J. Org. Chem.* 29, 2670 (1964)). Anschließend wird beispielsweise das erhaltene Hydroxyethyluracil mit Methansulfonsäurechlorid in Pyridin mesyliert zu (J.D. Fissekis, F. Sweet, *J. Org.*

*Chem.* 38, 264 (1973)). Danach wird im allgemeinen mit Natriumazid in DMF das Reaktionsprodukt zum Azid umgesetzt und dieses mit Triphenylphosphin in Pyridin zum Aminoethyluracil reduziert. Die Aminofunktion wird schließlich z.B. mit N-Ethoxycarbonylphthalimid geschützt. Nukleosidierung eines Ribosetetrabenzoats mit N-Phthaloylaminoethyluracil liefert beispielsweise einen Ribosetribenzoat-Linker in guten Ausbeuten. Anschließende Abspaltung der Benzoatschutzgruppen mit NaOMe in MeOH liefert das Linkertriol, welches beispielsweise bei -78°C in Pyridin/Dichlormethan 1:10 in Gegenwart von DMAP mit Benzoylchlorid umgesetzt werden kann. Dabei erhält man neben dem gewünschten 2'-Benzoat (64%) auch 2',4'-dibenzoyliertes Produkt (22%), welches gesammelt und wieder in das Triol umgewandelt werden kann. Das 2'-Benzoat wird z.B. mit Dimethoxytritylchlorid in Gegenwart von Hünig-Base in Dichlormethan in 4'-Position in Ausbeuten größer 90% trityliert. Die Umlagerung von 4'-DMT-2'-benzoat zum 4'-DMT-3'-benzoat erfolgt z. B. in Gegenwart von DMAP, p-Nitrophenol und Hünig-Base in n-Propanol/Pyridin 5:2. Nach Chromatographie wird das 4'-DMT-3'-benzoat erhalten, welches abschließend z. B. mit CIP(OAll)N(iPr)<sub>2</sub> in Gegenwart von Hünig-Base zum Phosphoramidit umgesetzt werden kann. Dieser läßt sich ohne Änderung der Syntheseprotokolle für die automatisierte Oligonucleotidsynthese einsetzen.

20

Die folgenden Figuren und Beispiele sollen die Erfindung näher beschreiben, ohne sie zu beschränken.

## 25 BESCHREIBUNG DER FIGUREN

Fig. 1 zeigt einen Ausschnitt aus der Struktur von RNA in ihrer natürlich vorkommenden Form (links) und in Form einer p-NA (rechts).

30 Fig. 2 zeigt schematisch die Synthese eines p-Ribo(A,U)-Oligonucleotids nach Pitsch et al. (1993).

Fig. 3 zeigt schematisch das erfindungsgemäße Verfahren einschließlich weiterer Ausführungsformen.

5

## DEFINITIONEN DER ABKÜRZUNGEN

BSA	bedeutet Bis(trimethylsilyl)acetamid
TMS-OTf	bedeutet Trimethylsilyltrifluoromethylsulfonat
10 AlOH	bedeutet Allylalkohol
DMF	bedeutet Dimethylformamid
Bz	bedeutet Benzoyl
ibu	bedeutet Isobutyryl
THF	bedeutet Tetrahydrofuran
15 TsOH	bedeutet Toluolsulfonsäure
DMT	bedeutet Dimethoxytrityl
DMAP	bedeutet Dimethylaminopyridin
CPG	bedeutet „controlled pore glass“

20

## BEISPIELE

### 25 **Synthese eines Oligomeren der Sequenz G<sub>3</sub>CG<sub>3</sub>C**

#### Vorbereitung:

Die für die Synthese der geplanten Sequenz benötigte Menge an Phosphoramiditen (320 µl / Kopplungsschritt) sowie das benötigte Quantum an Tetrazol-Gemisch (650 µl Kopplungsschritt einer 0,35 M Tetrazol / 0,15 M p-Nitrophenyltetrazol-Lsg.) wurde je in ein Synthesizer-Gläschen eingewogen und

30

mindestens 14 Stunden im Hochvakuum über KOH-Plätzchen (Exsikkator) getrocknet. Dann wurde die Mischung in dem benötigten Volumen an CH<sub>3</sub>CN gelöst und mit ca. 5 Kugeln aktiviertem Molekularsieb 4 Å versetzt. Die Gläschen wurden mit einem Septum verschlossen und mindestens weitere 14 Stunden bei  
5 RT aufbewahrt.

#### Aufbau:

Der Aufbau der Sequenz am DNA-Synthesizer (Pharmacia Gene Assembler) erfolgte prinzipiell wie derjenige von DNA-Oligonukleotiden gemäß den Standardbedingungen des Automatenherstellers PHARMACIA, D-Freiburg. Bei der  
10 Synthese wurde die letzte Tritylgruppe am Oligonukleotid belassen ("Trityl on"). Es wurden folgende Änderungen der Standardbedingungen eingeführt:

- 15 1. Die Detritylierungszeiten wurden auf 7 min. verlängert;
2. Es wurde eine 6 %ige (statt 3 %ige) Lösung von Dichloressigsäure in Dichlo-rethan verwendet;
3. Die Kopplungszeit wurde auf 30 min. verlängert.

20 Für den Aufbau wurde von 400 mg eines mit p-Ribo-C-Baustein beladenen Trägers ausgegangen (= 10 µmol).

#### Entschützung:

25 Nach dem Aufbau wurde der sich noch in der Kartusche befindende Träger am Vakuum getrocknet (ca. 30 min.) und mit einer vorbereiteten Lösung von 60 mg (66 µmol) Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0), 60 mg Triphenylphosphin (225 µmol), und 60 mg (170 µmol) Diethylammonium-hydrogencarbonat in 4,5 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> versetzt. Das Gemisch wurde 5 Stunden bei Raumtemperatur (RT)  
30 geschüttelt, dann der Träger abfiltriert und nacheinander mit 20 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und

25 ml Aceton gewaschen. Er wurde in 4,5 ml 0,1 M Natrium-N,N-diethyldithiocarbamat-Lösung aufgenommen und 30 min. bei RT stengelassen. Danach wurde wiederum abfiltriert und es wurde nacheinander mit 10 ml H<sub>2</sub>O, 15 ml Aceton und 10 ml EtOH gewaschen.

5

Anschließend wurde der Träger in 3,6 ml H<sub>2</sub>O / 0,9 ml Hydrazin-Hydrat aufgenommen und 30 Stunden bei 4° (Kühlraum) mittels eines Motors gedreht. Dann wurde an 1 x 4 cm RP-C<sub>18</sub>-Kieselgel chromatographiert. Dazu wurde das Säulenmaterial in CH<sub>3</sub>CN aufgeschlämmt und in eine Säule (1 x 5 cm) gefüllt. Es wurde mit 50 ml CH<sub>3</sub>CN, 50 ml 2 % NEt<sub>3</sub> in CH<sub>3</sub>CN und dann mit 50 ml 0,1 M TEAB-Puffer konditioniert. Daraufhin wurde die Probe in 0,1 M TEAB-Puffer aufgetragen; es wurde mit 50 ml 0,1 M TEAB-Puffer, 30 ml H<sub>2</sub>O und dann mit H<sub>2</sub>O → H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN 1 : 1 eluiert. Die Detektion der Produkte erfolgte UV-photometrisch. Die produkthaltigen Fraktionen wurden eingedampft, in 15 ml H<sub>2</sub>O/HCOOH 1 : 4 aufgenommen, 15 min. bei RT stengelassen, eingedampft, mit 5 ml H<sub>2</sub>O versetzt, wiederum eingedampft und an Sepak (Fa. Waters) chromatographiert. Dazu wurde die Kartusche mit 15 ml CH<sub>3</sub>CN und dann mit 15 ml 0,1 M TEAB-Puffer gewaschen. Die Oligonukleotid-haltige Lösung wurde in 0,1 M TEAB-Puffer aufgetragen; dann wurde mit 10 ml 0,1 M TEAB-Puffer und anschließend mit einem H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN-Gradienten eluiert (0 → 50 %). Es wurden Fraktionen à 1,5 ml gesammelt; diese wurden im UV analysiert.

Die produkthaltigen Fraktionen wurden eingedampft und HPLC-chromatographisch gereinigt. Danach wurden die vereinigten, produkthaltigen Fraktionen an Sepak, wie oben beschrieben, entsalzt. Das Produkt wurde als wäßrige Lösung (10 ml) im gefrorenen Zustand aufbewahrt. UV-spektroskopisch ergab sich eine Ausbeute von 25 % (= 250 o.D.)

#### Charakterisierung:

HPLC: Retentionszeit 15,3 min. an einer *Aquapore* RP-300, 7  $\mu$ m, 220 x 4,6 mm, Fluß 1 ml / min.; Puffer A: 0,1 M NEt<sub>3</sub> / 0,1 M AcOH (pH 7,0) in H<sub>2</sub>O, Puffer B: 0,1 M NEt<sub>3</sub> / 0,1 M AcOH (pH 7,0) in H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN 1 : 4; Gradient: 100% A →  
5 70% A / 30 % B. Detektion 260 nm.

UV:  $\lambda_{\text{max}}$ : 257 nm.

MALDI-TOF-MS: [M-1]<sub>calc</sub>= 2617; [M-1]<sub>obs</sub>=2617.

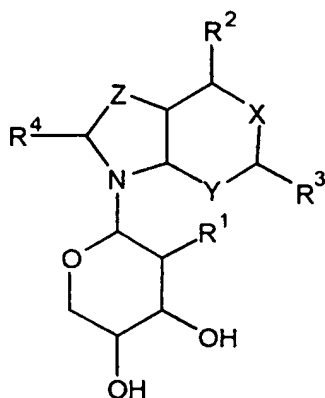
5

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines 3', 4'-cyclischen Acetals eines Pentopyranosyl-Nucleosids, dadurch gekennzeichnet, daß ein Pentopyranosyl-Nucleosid mit einem Aldehyd, Keton, Acetal oder Ketal unter Unterdruck umgesetzt wird.  
10
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung bei weniger als ca. 500 mbar, vorzugsweise bei weniger als ca. 100 mbar, insbesondere bei weniger als ca. 50 mbar, vor allem bei ca. 30 mbar durchgeführt wird.  
15
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Aldehyd ausgewählt ist aus Formaldehyd, Acetaldehyd, Benzaldehyd oder 4-Methoxybenzaldehyd, das Acetal aus Formaldehyd-dimethylacetal, Acetaldehyd-dimethylacetal, Benzaldehyd-dimethylacetal, oder 4-Methoxybenzaldehyd-dimethylacetal, das Keton aus Aceton, Cyclopentanon oder Cyclohexanon und das Ketal aus Acetondimethylketal, Cyclopentanon-dimethylketal, Cyclohexanon-dimethylketal oder in Form von 2-Methoxypropen.  
20
- 25 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß das Pentopyranosyl-Nucleosid vor der Umsetzung gereinigt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Pentopyranosyl-Nucleosid über SiO<sub>2</sub> vorzugsweise in der neutralisierten Form gereinigt wird.  
30



6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß als Pentopyranosyl-Nucleosid ein Ribo-, Arabino-, Lyxo- oder Xylo-pyranosyl-Nucleosid eingesetzt wird.
- 5 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß als Pentopyranosyl-Nucleosid ein Pentopyranosyl-purin, -2,6-diaminopurin, -6-purinthiol, -pyridin, -pyrimidin, -adenosin, -guanosin, -isoguanosin, -6-thioguanosin, -xanthin, -hypoxanthin, -thymidin, -cytosin, -isocytosin, -indol, -tryptamin, -N-phthaloyltryptamin, -uracil, -coffein, -theobromin, -theophyllin, -benzotriazol oder -acridin eingesetzt wird.
- 10 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß ein Pentopyranosyl-Nucleosid der Formel (I)



(I),

worin

$R^1$  gleich H, OH oder Hal mit Hal gleich Br oder Cl,

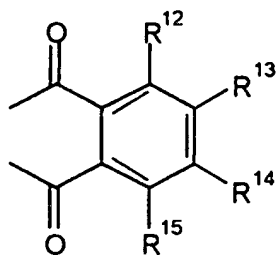
$R^2$ ,  $R^3$  und  $R^4$  unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils H,

Hal mit Hal gleich Br oder Cl,  $NR^5R^6$ ,  $OR^7$ ,  $SR^8$ ,  $=O$ ,  $C_nH_{2n+1}$  mit n eine gan-

20 ze Zahl von 1-12, vorzugsweise 1-8, insbesondere 1-4, oder  $(C_nH_{2n})NR^{10}R^{11}$

mit  $R^{10}R^{11}$  gleich H,  $C_nH_{2n+1}$  oder  $R^{10}R^{11}$  verbunden über einen Rest der

Formel



(III),

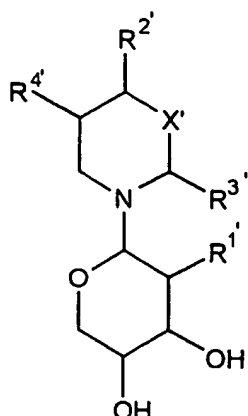
worin  $R^{12}$ ,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$  und  $R^{15}$  unabhängig voneinander, gleich oder verschieden,  
 5 jeweils H,  $OR^7$ , wobei  $R^7$  die genannte Bedeutung hat, oder  $C_nH_{2n+1}$ , oder  
 $C_nH_{2n-1}$ , wobei n die oben genannte Bedeutung hat, bedeuten und

$R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$  und  $R^8$  unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils  
 H,  $C_nH_{2n+1}$ , oder  $C_nH_{2n-1}$ , wobei n die oben genannte Bedeutung hat,  $-C(O)R^9$   
 mit  $R^9$  gleich ein linearer oder verzweigter, gegebenenfalls substituierter Al-

10 kyl-, Aryl-, vorzugsweise Phenyl-Rest,

X, Y und Z unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils =N-,  
 $=C(R^{16})-$  oder  $-N(R^{17})-$  mit  $R^{16}$  und  $R^{17}$  unabhängig voneinander, gleich  
 oder verschieden, jeweils H oder  $C_nH_{2n+1}$  oder  $(C_nH_{2n})NR^{10}R^{11}$  mit den oben  
 genannten Bedeutungen, bedeutet,

15 oder der Formel (II)



(II),

worin  $R^{1'}$  gleich H, OH oder Hal mit Hal gleich Br oder Cl,  
 5  $R^{2'}$ ,  $R^{3'}$  und  $R^{4'}$  unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils H,  
 Hal mit Hal gleich Br oder Cl,  $=O$ ,  $C_nH_{2n+1}$  oder  $OC_nH_{2n-1}$ , oder  
 $(C_nH_{2n})NR^{10'}R^{11'}$ , wobei  $R^{10'}$ ,  $R^{11'}$ , unabhängig voneinander die oben ge-  
 nannte Bedeutung von  $R^{10}$  bzw.  $R^{11}$  hat, und  
 $X'$  jeweils  $=N-$ ,  $=C(R^{16'})-$  oder  $-N(R^{17'})-$  bedeutet, wobei  $R^{16'}$  und  $R^{17'}$  unab-  
 10 hängig voneinander die oben genannte Bedeutung von  $R^{16}$  bzw.  $R^{17}$  haben,  
 umgesetzt wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß die  
 Umsetzung bei einer Temperatur von ca. 40-70 °C, vorzugsweise ca. 50-60  
 15 °C, insbesondere ca. 50-55 °C erfolgt.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß die  
 Umsetzung in Gegenwart einer Säure erfolgt.

20 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Säure ausge-  
 wählt ist aus p-Toluolsulfonsäure, Methansulfonsäure, Tetrafluoroborsäure,  
 Schwefelsäure, sauren Ionenaustauscher und/oder Lewissäuren.

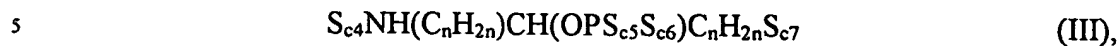
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-11, dadurch gekennzeichnet, daß in einem weiteren Schritt das erhaltene 3', 4'-cyclische Acetal eines Pentopyranosyl-Nucleosids an der 2'-Position geschützt wird.
- 5 13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die 2'-Position durch eine basenlabile oder metallkatalysiert abspaltbare Schutzgruppe, vorzugsweise durch eine Acylgruppe, insbesondere durch eine Acetyl-, Benzoyl-, Nitrobenzoyl- und/oder Methoxybenzoylgruppe, geschützt wird.
- 10 14. Verfahren zur Herstellung eines Pentopyranosyl-Nucleosids, dadurch gekennzeichnet, daß das an der 2'-Position geschützte 3', 4'-cyclische Acetal eines Pentopyranosyl-Nucleosids gemäß Anspruch 12 oder 13 deketalisiert wird.
- 15 15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Deketalisierung in Gegenwart einer Säure, vorzugsweise in Gegenwart einer starken Säure erfolgt.
16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß das erhaltene Reaktionsprodukt trocken-basisch aufgearbeitet wird.
- 20 17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die trocken-basische Aufarbeitung in Anwesenheit von festem Hydrogencarbonat, Carbonat und/oder basischem Ionenaustauscher erfolgt.
- 25 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 14-17, dadurch gekennzeichnet, daß in einem weiteren Schritt die 4'-Position geschützt wird.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die 4'-Position  
30 durch eine säure- oder basenlabile Schutzgruppe, vorzugsweise durch eine

Trityl-Gruppe, insbesondere durch eine DMT-Gruppe, und/oder durch eine  $\beta$ -eliminierbare Gruppe, insbesondere eine Fmoc-Gruppe, geschützt wird.

20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß in einem  
5 weiteren Schritt eine Umlagerung der Schutzgruppe von der 2'-Position zur 3'-Position erfolgt.
21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Umlagerung  
in Gegenwart einer Base, insbesondere in Gegenwart von N-Ethyl-diisopro-  
10 pylamin und/oder Triethylamin durchgeführt wird.
22. Verfahren zur Herstellung eines Pentopyranosyl-nucleosids, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß
- (a) eine geschützte Nucleobase mit einer geschützten Pentopyranose umge-  
15 setzt wird,
- (b) die Schutzgruppen von dem Pentopyranosyl-Teil des Produktes aus  
Schritt (a) abgespalten werden, und
- (c) das Produkt aus Schritt (b) gemäß dem Verfahren nach einem der An-  
sprüche 1-21 umgesetzt wird.
- 20
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 20-22, dadurch gekennzeichnet, daß das  
erhaltene Pentopyranosyl-nucleosid in einem weiteren Schritt phosphityliert  
oder an eine feste Phase gebunden wird.
- 25
24. Verfahren zur Herstellung einer Pentopyranosyl-Nucleinsäure, dadurch ge-  
kennzeichnet, daß
- (a) in einem ersten Schritt ein Pentopyranosyl-Nucleosid nach einem der  
Ansprüche 20-22 hergestellt wird,

- (b) in einem zweiten Schritt das gemäß Schritt (a) hergestellte Pentopyranosyl-Nucleosid an eine feste Phase gebunden wird, und
- (c) in einem weiteren Schritt das gemäß Schritt (b) an eine feste Phase gebundene 3'-, 4'-geschützte Pentopyranosylnucleosid um ein phosphoryliertes 3'-, 4'-geschütztes Pentopyranosyl-Nucleosid verlängert wird, und
- (d) Schritt (c) wiederholt wird.
25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt (b) und/oder Schritt (c) auch mindestens ein Pentofuranosyl-nucleosid eingebaut wird.
26. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß als Kupplungsreagenz für die Verlängerung gemäß Schritt (c) saure Aktivatoren, vorzugsweise p-Nitrophenyltetrazol, insbesondere Benzimidazoliumtriflat eingesetzt werden.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 24-26, dadurch gekennzeichnet, daß in einem weiteren Schritt (e) die Schutzgruppen und das gebildete Oligomer von der festen Phase abgespalten werden.
28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Abspaltung durch Hydrazinolyse erfolgt.
29. Verfahren nach Anspruch 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, daß das erhaltene Oligomer chromatographisch gereinigt wird.
30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß die chromatographische Reinigung über alkylsilyliertem Kieselgel, vorzugsweise über RP-C<sub>18</sub>-Kieselgel erfolgt.

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 24-30, dadurch gekennzeichnet, daß in einem weiteren Schritt ein Allyloxy-Linker der Formel (III)



worin  $S_{c4}$  und  $S_{c7}$  unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils eine Schutzgruppe insbesondere ausgewählt aus Fmoc und/oder DMT,  
 $S_{c5}$  und  $S_{c6}$  unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils eine  
10 Allyloxy- und/oder Diisopropylamino-Gruppe und n eine ganze Zahl von 1-12, vorzugsweise 1-8, insbesondere 1-4 bedeuten, eingebaut wird.

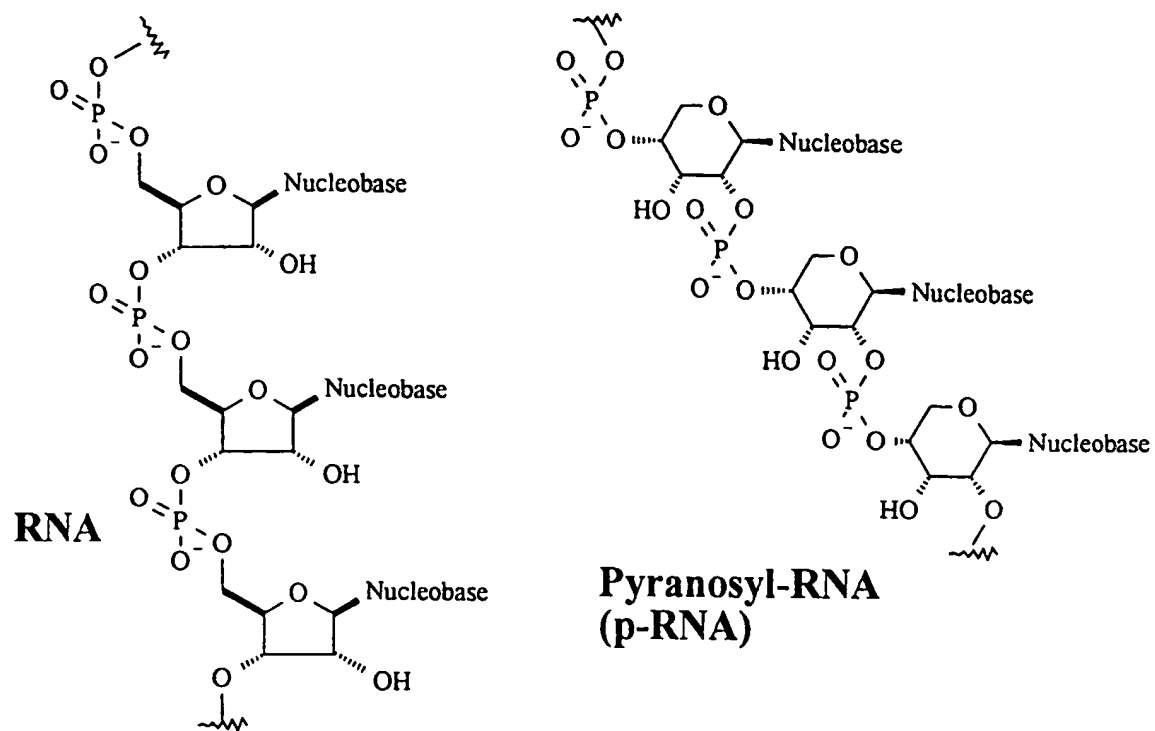
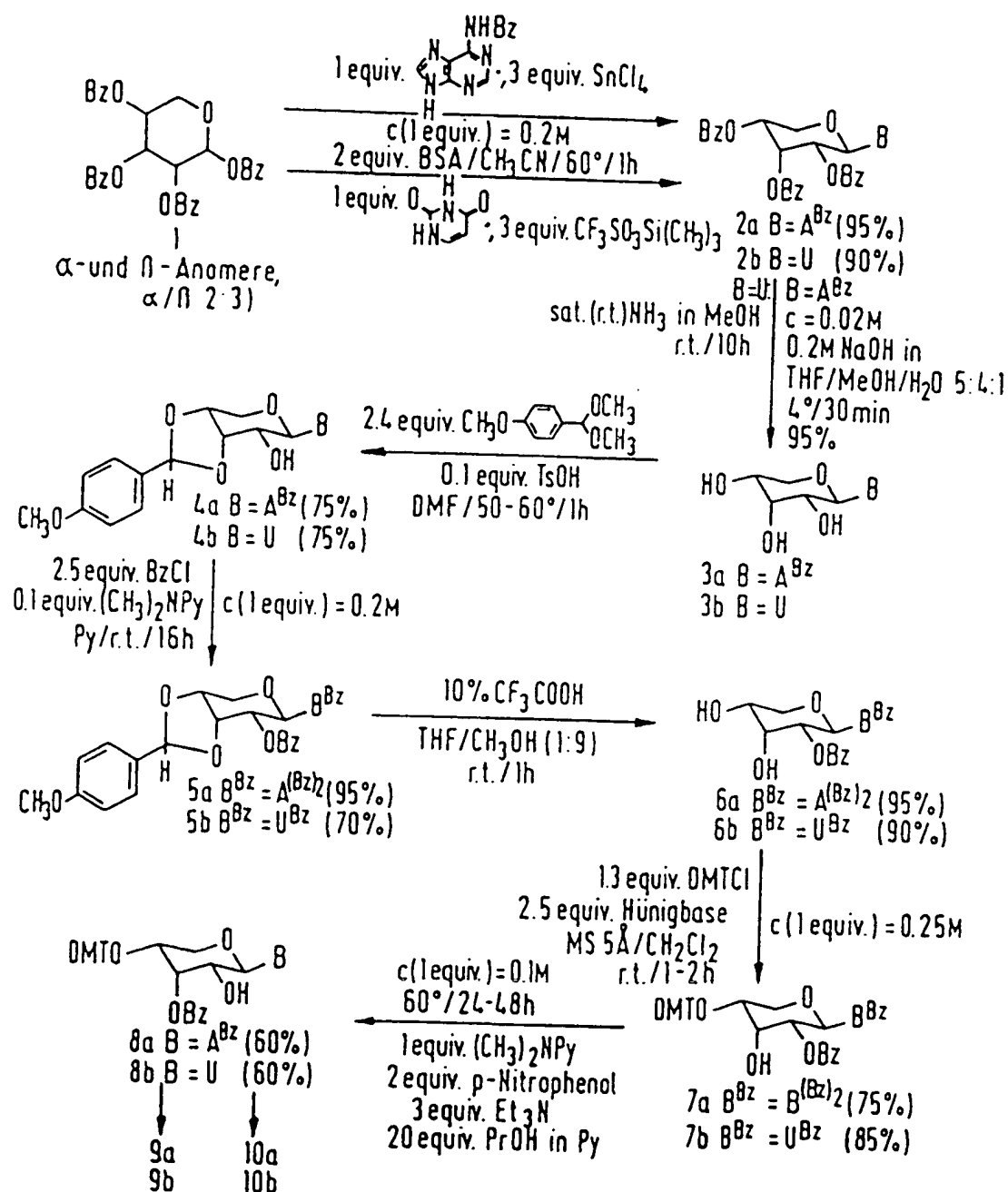


Fig. 1



Fig. 2A



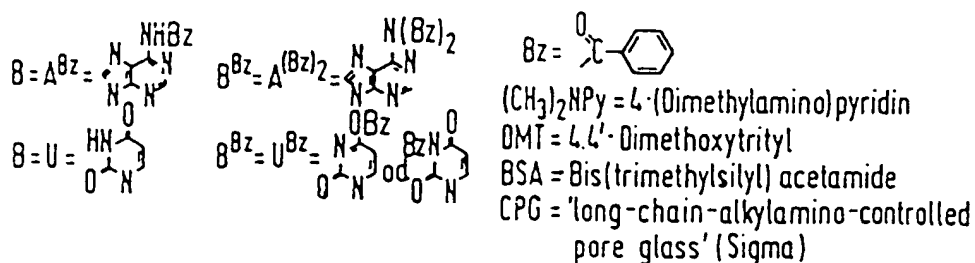
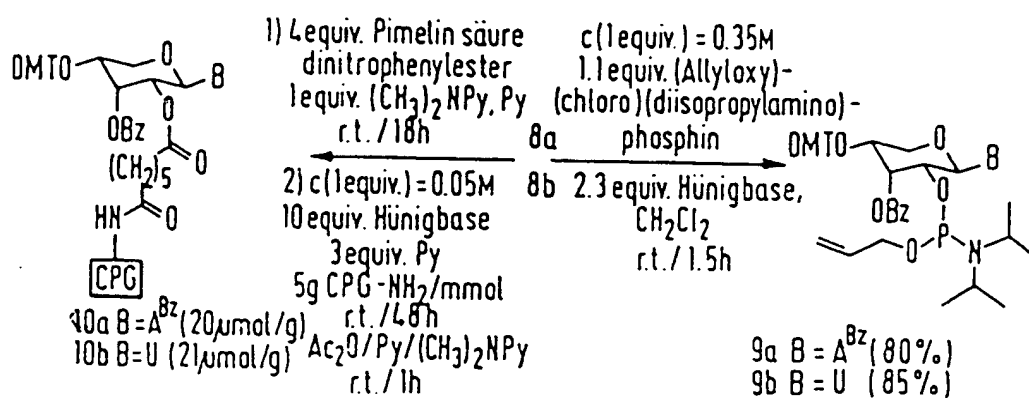
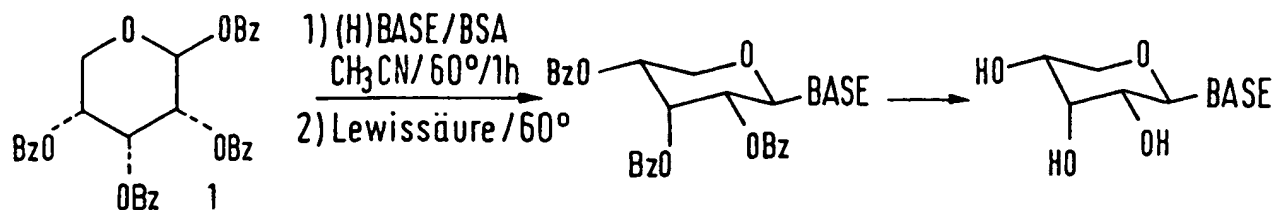
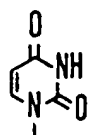


Fig. 2B



BASE =

U



TMS-OTf / 1h

BASE =

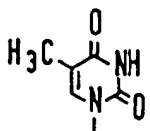
U: 2; 90 %

 $\text{NH}_3/\text{MeOH}/\text{RT}/10\text{h}$ 

BASE =

U: 7; crude

T



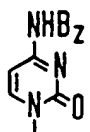
TMS-OTf / 3h

T: 3; 90 %

 $\text{NH}_3/\text{MeOH}/\text{RT}/18\text{h}$ 

T: 8; 82 %

CBz



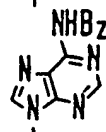
TMS-OTf / 5h

CBz: 4; 81 %

 $\text{NaOH}/\text{MeOH}/\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$   
 $4^\circ/30\text{min}$ 

CBz: 9; 68 %

ABz

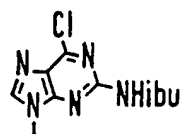
 $\text{SnCl}_4/1\text{h}$ 

ABz: 5; 88 %

 $\text{NaOH}/\text{MeOH}/\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$   
 $4^\circ/30\text{min}$ 

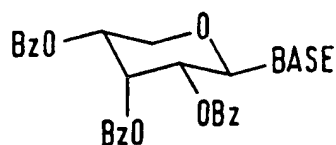
ABz: 10; 87 %

PurCl, NHibu



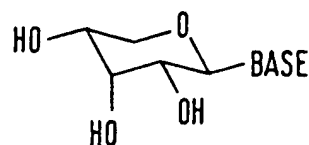
TMS-OTf / 3h

PurCl, NHibu: 6; 70 %



BASE =

PurCl NHibu: 6

 $\text{AlI}(\text{OH})/\text{N}(\text{Me})_3/\text{Cs}_2\text{CO}_3$   
 $4^\circ-\text{RT}/2\text{h}$ 

BASE =

Gall, ibu: 11; 81 %

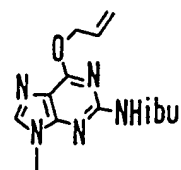


Fig. 3A

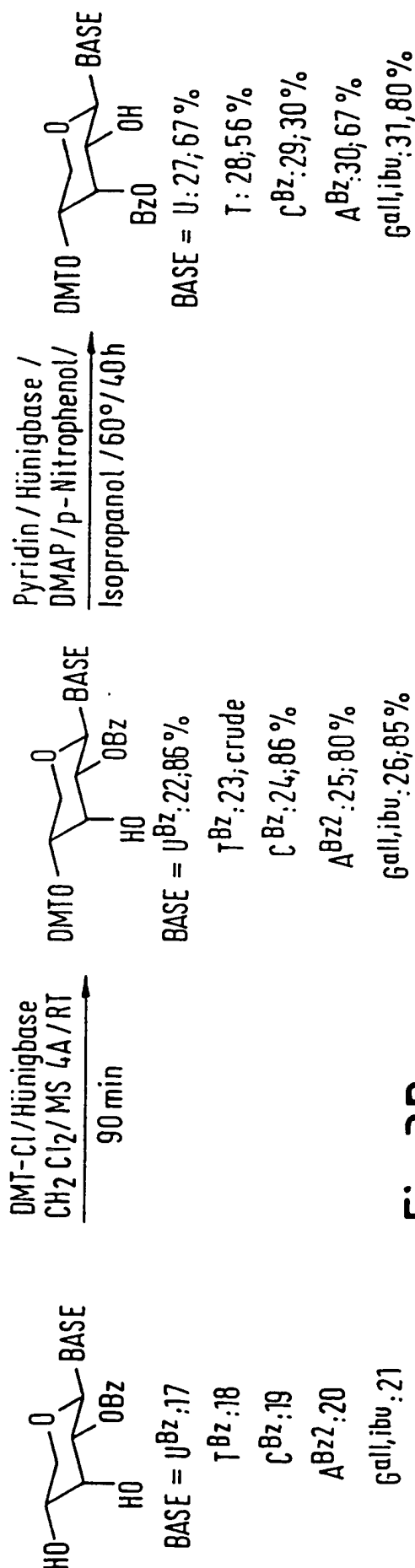
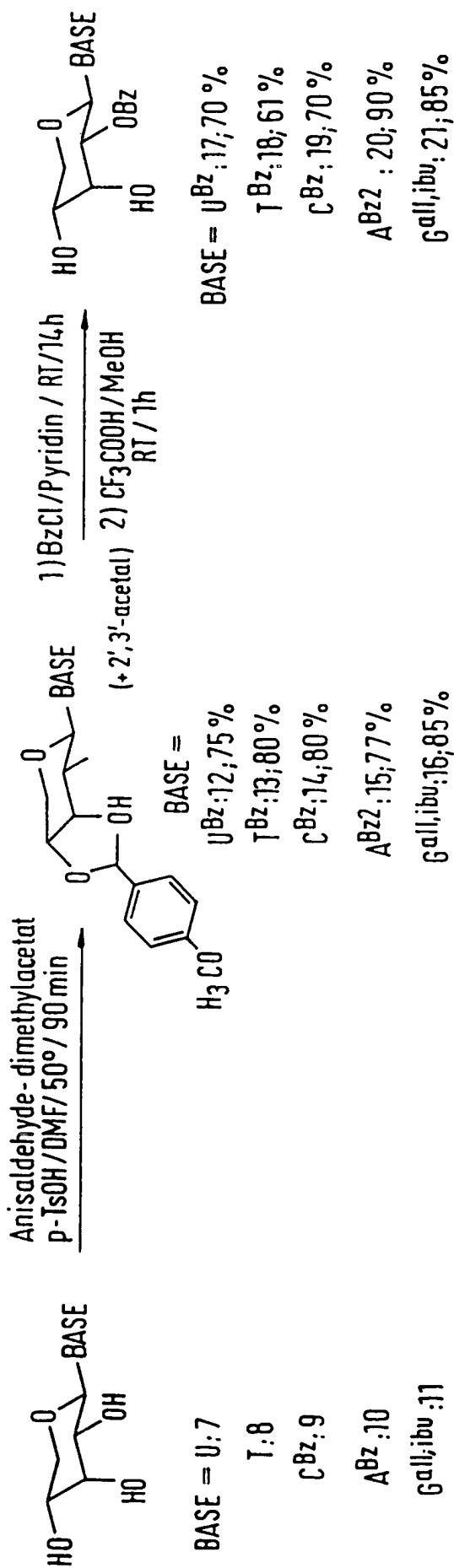


Fig. 3B

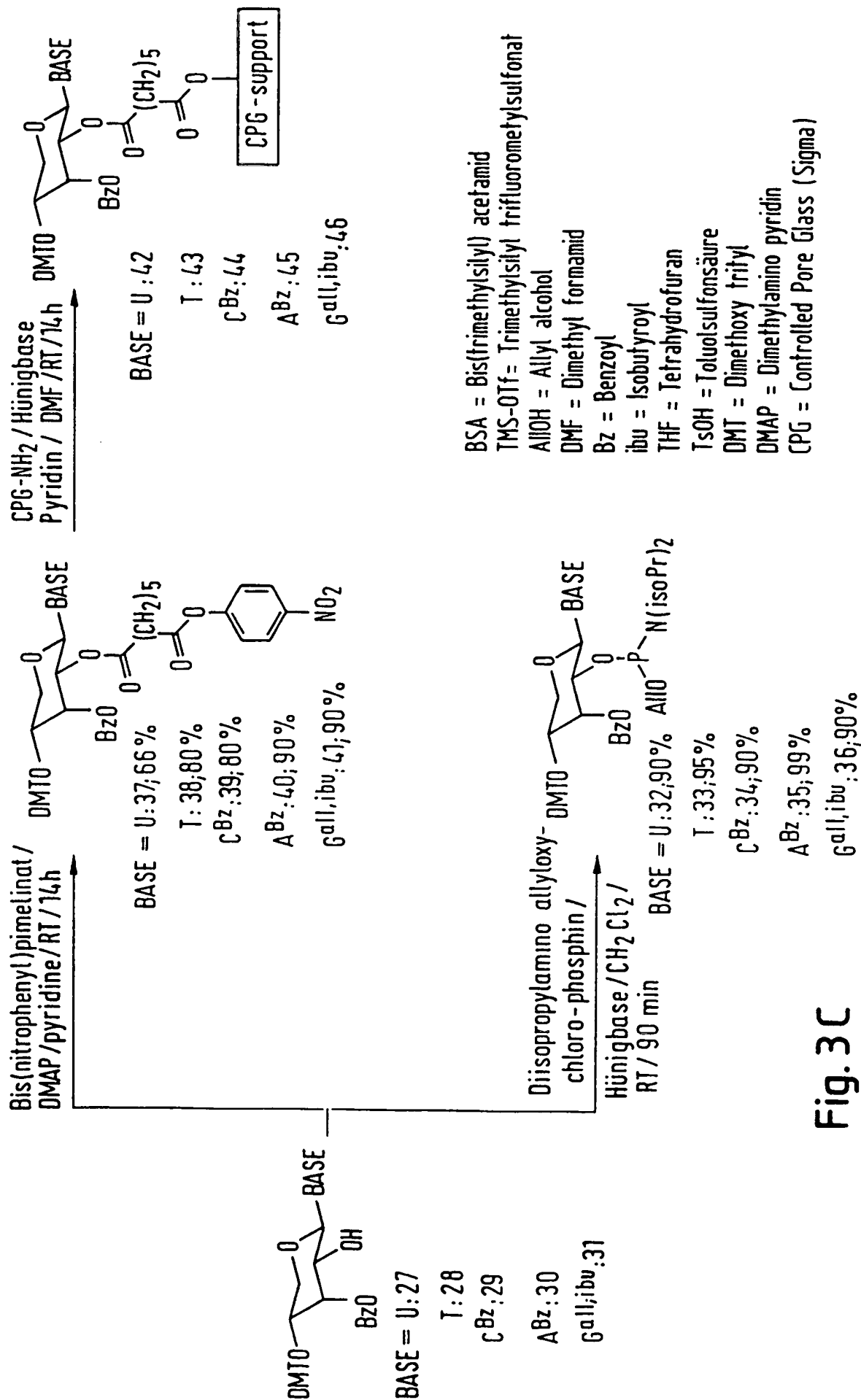


Fig. 3C

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**